



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 101 10 053.1  
**Anmeldetag:** 02. März 2001  
**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE  
**Bezeichnung:** Neue für das oxyR-Gen kodierende  
Nukleotidsequenzen  
**Priorität:** 26.08.2000 DE 100 42 052.4  
**IPC:** C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 05. Juli 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Nietiedt

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Achim MARX et al

SERIAL NO: New U.S. Application

FILED: Herewith

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE oxyR GENE

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

#3  
M.G.J  
7/25/02

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☒ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number 60/279,415 filed March 29, 2001 is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	100 42 052.4	August 26, 2000
GERMANY	101 10 053.1	March 2, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)
  - ☐ are submitted herewith
  - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618

Daniel J. Pereira, Ph.D.  
Registration No. 45,518



22850

### Neue für das oxyR-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das oxyR-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von Bakterien, in denen das oxyR-Gen verstärkt wird. Das oxyR-Gen kodiert für den Transkriptionsregulator OxyR, welcher zur LysR-Familie gehört.

#### 10 Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

- 15 Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der grossen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen
- 20 können fermentationstechnische Massnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel
- 25 Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

- Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion
- 30 und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für

regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Lysin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

#### Aufgabe der Erfindung

10 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Massnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

#### Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschliesslich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint.

Werden im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt, sind damit auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das oxyR-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No.2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
5 Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

10 wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators OxyR aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 15 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i), die die Aktivität des Proteins/Polypeptides nicht verändern

25 Weitere Gegenstände sind

- a) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1 und 490;

- b) Polynukleotide enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der  
Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den  
Positionen 491 und 1471; und
- 5 c) Polynukleotide enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der  
Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den  
Positionen 1472 und 1675.

Weitere Gegenstände sind

- 10 ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA,  
enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1  
dargestellt;

- ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die  
Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt,  
15 enthält;

- ein Vektor, enthaltend die für das oxyR-Gen kodierende  
DNA-Sequenz von *C. glutamicum*, hinterlegt in  
*Corynebacterium glutamicum* als pT-oxyRexp unter  
DSM 13457, und

- 20 als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den  
Vektor enthalten oder in denen das oxyR-Gen verstärkt  
ist.

- Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im  
wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die  
25 erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung  
einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,  
die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit  
einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemässen  
Polynukleotids gemäss SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon  
30 enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäss der Erfindung sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator OxyR kodieren, oder um solche Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des oxyR-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu detektieren und zu bestimmen.

Polynukleotidsequenzen gemäss der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Transkriptionsregulator OxyR kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäss Erfindung schliessen ein Polynukleotid gemäss SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu



wenigstens besonders 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ  
5 ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragmentes.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäss Erfindung schliessen ein Polypeptid  
10 gemäss SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Transkriptionsregulator OxyR und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu  
15 wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäss SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus  
20 der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits  
25 Aminosäuren produzieren und in denen die für das oxyR-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder  
30 mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das

für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Massnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin  
5 aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art  
10 Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C.glutamicum), sind  
15 besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032  
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806  
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870  
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539  
20 Corynebacterium melassecola ATCC17965  
Brevibacterium flavum ATCC14067  
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und  
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten bzw.  
25 Stämme, wie beispielsweise

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709  
Brevibacterium flavum FERM-P 1708  
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712  
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463  
30 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und  
Corynebacterium glutamicum DSM5715.

Den Erfindern gelang es, das neue, für den Transkriptionsregulator OxyR kodierende oxyR-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

Zur Isolierung des oxyR-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Viera et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschliessend wiederum in gängige für die Sequenzierung

geeignete Vektoren subkloniert und anschliessend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen oxyR kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des oxyR-Genproduktes dargestellt. Es ist bekannt, daß wirtseigene Enzyme die N-terminale Aminosäure Methionin bzw. Formylmethionin des gebildeten Proteins abspalten können.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, dass Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann

unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schliesslich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d.h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70 % identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschliesslich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70 % Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70 % oder mindestens 80 % oder mindestens 90 % bis 95 % Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, dass coryneforme Bakterien nach Überexpression des oxyR-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des

Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im

5 Verlaufe der fermentativen L-Lysin-Produktion zu steigern. Durch Massnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte

10 können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

15 Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen

20 Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung

25 WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in

30 bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemässe oxyR-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche

35 bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al.,

- Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere
- 5 Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.
- 10 Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen das oxyR-Gen überexprimiert werden kann, ist der E.coli-C.glutamicum Shuttle Vektor pT-oxyRexp. Er enthält die Replikationsregion rep des Plasmides pGA1 einschliesslich des Replikationseffectors per (US-A- 5,175,108; Nesvera et
- 15 al., Journal of Bacteriology 179, 1525-1532 (1997)), das Tetracyclinresistenz vermittelnde tetA(Z)-Gen des Plasmids pAG1 (US-A- 5,158,891; Genbank-Eintrag beim National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) mit der accession number AF121000, den Replikationsursprung
- 20 oriV des Plasmids pMB1 (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 43, 77-90 (1979)), das lacZ $\alpha$  Genfragment einschliesslich des lac-Promotors und einer Mehrfachklonierschnittstelle („multiple cloning site“, mcs) (Norrander, J.M. et al. Gene 26, 101-106
- 25 (1983)) und die mob-Region des Plasmids RP4 (Simon et al., (1983) Bio/Technology 1:784-791).

Das Plasmid pT-oxyRexp ist in Figur 2 dargestellt.

- Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch
- 30 Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige
- 35 Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt



(typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschliessend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben dem oxyR-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentosephosphat-Zyklus, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken.

So kann beispielsweise für die Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

◦ das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 5 ◦ das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)),
- das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388)
- 15 ◦ das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222)
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al. (1998), European Journal of Biochemistry 254: 395-403),
- 20 ◦ das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die 6-Phosphogluconat Dehydrogenase kodierende Gen gnd (US: 09/531,265),
- das für die Superoxid-Dismutase kodierende Gen sod (US: 09/373,731),
- 25 ◦ das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1 (DE: 199 59 328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des oxyR-Gens eines oder mehrere Gene ausgewählt aus der Gruppe

- 5    ◦ das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE: 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US: 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB  
10    (DE: 199 51 975.7, DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2  
     (DE: 199 59 327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem
- 15    Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel
- 20    verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese
- Maßnahmen kombiniert.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren,
- 25    insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des oxyR-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London,
- 30    UK, 1982).

Die erfindungsgemäss hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen  
5 enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schliesslich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen  
10 zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen  
15 wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur  
20 Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff  
haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur  
25 eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an Lysin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

30 Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie  
35 kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei

Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

5 Eine Reinkultur des Stammes *Corynebacterium glutamicum* DSM5715/pT-oxyRexp wurde am 13. April 2000 als DSM 13457 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.

10 Eine Reinkultur des Stammes *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pEC-T18mob2 wurde am 25. Januar 2000 als DSM 13244 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.

Das erfindungsgemässe Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

15 Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

20 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

25 Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

#### Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

30 Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)

beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschliessend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschliessend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin

ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

### Beispiel 2

#### Isolierung und Sequenzierung des oxyR-Gens

- 5 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 10 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im 15 Grössenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

- Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product 20 No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den 25 Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde 30 anschliessend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.



Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschliessend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 981 Basenpaaren, welches als oxyR-Gen bezeichnet wurde. Das oxyR-Gen kodiert für ein Protein von 327 Aminosäuren.

### Beispiel 3

Herstellung eines Shuttlevektors pT-oxyRexp zur Verstärkung des oxyR-Gens in C. glutamicum

#### 3.1. Klonierung des oxyR Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994))

chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des oxyR Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4).

5 OxyR (oxy-exp):

5` GAT CGA GAA TTC AAA GGA AGA TCA GCT TAG 3`

OxyR (oxy R2):

5` GGA AAA CCT CTA GAA AAA CT 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma ARK  
10 Scientific GmbH Biosystems (Darmstadt, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) die PCR Reaktion  
15 durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer die Amplifikation eines ca. 1,43 kb grossen DNA-Fragmentes, welches das oxyR Gen trägt. Ausserdem enthält der Primer OxyR (oxy-exp) die Sequenz für die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease EcoRI, und  
20 der Primer OxyR (oxy R2) die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease XbaI, die in der oben dargestellten Nukleotidabfolge durch Unterstreichen markiert sind.

Das amplifizierte DNA Fragment von ca. 1,43 kb, welches das  
25 oxyR Gen trägt, wurde mit dem Zero Blunt™ Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K2700-20) in den Vektor pCR®Blunt II (Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) ligiert. Anschliessend wurde der *E. coli* Stamm Top10 (Grant et al.,  
30 Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) mit dem Ligationsansatz nach Angaben des Kit-Herstellers (Firma Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des  
35 Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al.,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des

5 QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) isoliert und durch Behandlung mit den Restriktionsenzym XbaI und EcoRI mit anschliessender Agarosegel-Elektrophorese (0,8 %) überprüft. Die DNA Sequenz des amplifizierten DNA Fragmentes wurde durch

10 Sequenzierung überprüft. Das Plasmid wurde pCR-oxyRexp genannt. Der Stamm wurde als E. coli Top10 / pCR-oxyRexp bezeichnet.

### 3.2. Herstellung des E. coli - C. glutamicum Shuttle Vektors pEC-T18mob2

15 Nach dem Stand der Technik wurde der E. coli - C. glutamicum Shuttle-Vektor konstruiert. Der Vektor enthält die Replikationsregion rep des Plasmids pGA1 einschliesslich des Replikationseffectors per (US-A- 5,175,108; Nesvera et al., Journal of Bacteriology 179,

20 1525-1532 (1997)), das Tetracyclinresistenz vermittelnde tetA(Z)-Gen des Plasmids pAG1 (US-A- 5,158,891; Genbank-Eintrag beim National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) mit der accession number AF121000), die Replikationsregion oriV des Plasmids pMB1

25 (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 43, 77-90 (1979)), das lacZ $\alpha$  Genfragment einschliesslich des lac-Promotors und einer Mehrfachklonierschnittstelle (multiple cloning site, mcs) (Norrande, J.M. et al. Gene 26, 101-106 (1983)) und die

30 mob-Region des Plasmids RP4 (Simon et al., (1983) Bio/Technology 1:784-791). Der konstruierte Vektor wurde in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$  (Hanahan, In: DNA cloning. A Practical Approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden

35 Zellen erfolgte durch Ausplattieren des

Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al.,  
Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring  
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit  
5 mg/l Tetracyclin supplementiert worden war. Plasmid-DNA  
5 wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin  
Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch  
Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und HindIII  
anschliessender Agarosegel-Elektrophorese (0,8 %)   
überprüft. Das Plasmid wurde pEC-T18mob2 genannt und ist in  
10 Figur 1 dargestellt.

### 3.3. Klonierung von oxyR im E. coli-C. glutamicum Shuttle Vektor pEC-T18mob2

Als Vektor wurde der in Beispiel 3.2 beschriebene E. coli -  
C. glutamicum Shuttle-Vektor pEC-T18mob2 verwendet. DNA  
15 dieses Plasmids wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und  
XbaI vollständig gespalten und anschliessend mit shrimp  
alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,  
Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250)  
dephosphoryliert.

20 Aus dem in Beispiel 3.1. beschriebenen Plasmid pCR-oxyRexp  
wurde das oxyR Gen durch vollständige Spaltung mit den  
Enzymen EcoRI und XbaI isoliert. Das ca. 1400bp grosse oxyR  
Fragment wurde aus dem Agarosegel mit dem QiaExII Gel  
Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany)  
25 isoliert.

Das auf diese Weise gewonnene oxyR-Fragment wurde mit dem  
vorbereiteten Vektor pEC-T18mob2 gemischt und der Ansatz  
mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.  
30 27-0870-04) behandelt. Der Ligationsansatz wurde in den E.  
coli Stamm DH5α (Hanahan, In: DNA cloning. A Practical  
Approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA)  
transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen  
erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes

auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 5 mg/l Tetracyclin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI gespalten, um das Plasmid durch anschliessende Agarosegel-Elektrophorese zu überprüfen. Das erhaltene Plasmid wurde pT-oxyRexp genannt. Es ist in Figur 2 dargestellt.

#### Beispiel 4

Transformation des Stammes DSM5715 mit dem Plasmid pT-oxyRexp

Der Stamm DSM5715 wurde mit dem Plasmid pT-oxyRexp unter Anwendung der von Liebl et al., (FEMS Microbiology Letters, 53:299-303 (1989)) beschriebenen Elektroporationsmethode transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5 g/l Brain-Heart Infusion Boullion, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und 18 g/l Bacto-Agar, der mit 5 mg/l Tetracyclin supplementiert worden war. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 33°C.

Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144, 915 - 927), mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XbaI geschnitten und das Plasmid durch anschliessende Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Der erhaltene Stamm wurde DSM5715/pT-oxyRexp genannt.

Beispiel 5

## Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM5715/pT-oxyRexp wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz-Agar mit Tetracyclin (5 mg/l)) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

## Medium Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-Pepton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	10 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	2 % (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4 eingestellt

Diesem wurde Tetracyclin (5 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so dass die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,05 betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

## Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50 g/l
 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	 25 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
L-Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO <sub>3</sub>	25 g/l

5 CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschliessend wurden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO<sub>3</sub>.

10 Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Tetracyclin (5 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80 % Luftfeuchte.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Messwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	6,8	13,68
DSM5715/pT-oxyRexp	6,5	14,73



Folgende Figuren sind beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pEC-T18mob2

Figur 2: Karte des Plasmids pT-oxyRexp

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben  
5 folgende Bedeutung:

per:	Gen zur Kontrolle der Kopienzahl aus pGA1
oriV:	ColE1-ähnlicher Origin aus pMB1
rep:	Plasmidkodierte Replikationsregion aus C. glutamicum Plasmid pGA1
10 RP4mob:	RP4-Mobilisierungs-Site
lacZ-alpha:	lacZ-Genfragment aus E.coli
Tet:	Resistenzgen für Tetracyclin
oxyR:	oxyR-Gen von C.glutamicum
EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI
15 Ecl136II:	Schnittstelle des Restriktionsenzym
Ecl136II	
HindIII:	Schnittstelle des Restriktionsenzym HindIII
KpnI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym KpnI
SalI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym SalI
20 SmaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym SmaI
PstI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym PstI
BamHI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym BamHI
XbaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI
XmaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym XmaI
25 XhoI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym XhoI
PstI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym PstI

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa AG

5 &lt;120&gt; Neue für das oxyR-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000199 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1675

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (491)..(1471)

&lt;223&gt; oxyR-Gen

25

&lt;400&gt; 1

gccaaaccgca gggcatttac catcatggtg cgcaacgccca tgttcgcct tgtggagcta 60

30

tttgcttatg aaaaggaaga tcagcttagt cagatgactg aatacctgga tgaggctcct 120

gatttcggtg ctgcgatgga tgcgtacttt gatgaatatg cggatcttga taccggcccg 180

gcagctcgtg gaccagagtt cttcaaggta gagcacacgg gaagaatgtg ggaggtgcgt 240

35

caggtggtga aggatccaga aggtgataat tccttcgcgt ttgttgccac cattgatctt 300

gatgcctctg atgatgcagg tgaggtgcgt tttggatcgc tgtcgattga ccacaactag 360

40

gggtttgcgt cgaaaagcaa gcacgcctgg tgcttgattt gagcggtttt acctatggcg 420

ctttggcgcc gtcaaactgt cccagcgatt tcattattat tttcgtgcat tcaccgttat 480

agttataggc atg agc aat aaa gag tac cgg ccc aca ctc gcc cag ctt 529

45

Met Ser Asn Lys Glu Tyr Arg Pro Thr Leu Ala Gln Leu

1

5

10

cgc acc ttt gtc acc atc gca gaa tgc aag cac ttt ggt act gct gcc 577

Arg Thr Phe Val Thr Ile Ala Glu Cys Lys His Phe Gly Thr Ala Ala

50

15

20

25

acc aag ctg tcc att tcg cag cca tcc ctc tcc cag gca ctt gtc gca 625

Thr Lys Leu Ser Ile Ser Gln Pro Ser Leu Ser Gln Ala Leu Val Ala

30

35

40

45

55

tta gaa aca ggc ctg gga gtt cag ctg att gaa cgc tcc acc cgc aag 673

Leu Glu Thr Gly Leu Gly Val Gln Leu Ile Glu Arg Ser Thr Arg Lys

50

55

60

	gtc att gtc acc cca gcg ggc gag aag ttg ctg cca ttc gcc aaa tcc	721
	Val Ile Val Thr Pro Ala Gly Glu Lys Leu Leu Pro Phe Ala Lys Ser	
	65 70 75	
5	acc ctt gac gcg gcg gag tct ttc ctc tcc cac gcc aag ggc gcc aac	769
	Thr Leu Asp Ala Ala Glu Ser Phe Leu Ser His Ala Lys Gly Ala Asn	
	80 85 90	
10	ggt tcg ctc act gga ccg ttg acc gta ggc atc atc ccc acg gcg gct	817
	Gly Ser Leu Thr Gly Pro Leu Thr Val Gly Ile Ile Pro Thr Ala Ala	
	95 100 105	
15	cct tac att ttg ccg tca atg ctg tcc atc gtg gat gaa gaa tat cca	865
	Pro Tyr Ile Leu Pro Ser Met Leu Ser Ile Val Asp Glu Glu Tyr Pro	
	110 115 120 125	
20	gat ctg gaa cct cac atc gtc gag gac caa acc aag cat ctt ctc gcg	913
	Asp Leu Glu Pro His Ile Val Glu Asp Gln Thr Lys His Leu Leu Ala	
	130 135 140	
25	ttg ctg cgc gac ggc gcc atc gag gtc gcc atg atg gcc ctg cct tct	961
	Leu Leu Arg Asp Gly Ala Ile Asp Val Ala Met Met Ala Leu Pro Ser	
	145 150 155	
30	gag gca cca ggc atg aag gaa atc ccc ctc tac gac gaa gac ttt atc	1009
	Glu Ala Pro Gly Met Lys Glu Ile Pro Leu Tyr Asp Glu Asp Phe Ile	
	160 165 170	
35	gtc gtt aca gct agc gat cac ccc ttc gcc ggc cgc caa gac tta gaa	1057
	Val Val Thr Ala Ser Asp His Pro Phe Ala Gly Arg Gln Asp Leu Glu	
	175 180 185	
40	cta tcc gcc tta gaa gac ctc gat ctg ctg ctt ctc gac gac gga cac	1105
	Leu Ser Ala Leu Glu Asp Leu Asp Leu Leu Leu Leu Asp Asp Gly His	
	190 195 200 205	
45	tgc ctc cac gac caa att gtg gac ctg tgc cgc cgc gga gac atc aac	1153
	Cys Leu His Asp Gln Ile Val Asp Leu Cys Arg Arg Gly Asp Ile Asn	
	210 215 220	
50	ccc att agc tcc act act gct gtc acc cgc gca tcc agc ctt acc acc	1201
	Pro Ile Ser Ser Thr Thr Ala Val Thr Arg Ala Ser Ser Leu Thr Thr	
	225 230 235	
55	gtc atg cag ctc gtc gtc gcc ggc ctt gga tcc acc ttg gtc cca atc	1249
	Val Met Gln Leu Val Val Ala Gly Leu Gly Ser Thr Leu Val Pro Ile	
	240 245 250	
60	agc gca atc cca tgg gaa tgc acc cga cca gga ctg gca aca gcc aac	1297
	Ser Ala Ile Pro Trp Glu Cys Thr Arg Pro Gly Leu Ala Thr Ala Asn	
	255 260 265	
65	ttc aac tct gat gtc acc gca aac cgc cgc att gga ttg gtg tac cgt	1345
	Phe Asn Ser Asp Val Thr Ala Asn Arg Arg Ile Gly Leu Val Tyr Arg	
	270 275 280 285	
70	tcc tct tct tct cgc gcc gaa gag ttc gaa cag ttt gca ctc att ttg	1393
	Ser Ser Ser Ser Arg Ala Glu Glu Phe Glu Gln Phe Ala Leu Ile Leu	
	290 295 300	

cag cgc gct ttc caa gaa gcc gtc gcg ctt gct gcc tca act ggc atc 1441  
 Gln Arg Ala Phe Gln Glu Ala Val Ala Leu Ala Ala Ser Thr Gly Ile  
 305 310 315  
 5 acc ttg aag caa aat gtc gcg gta gcg cag taagtttttc tagaggtttt 1491  
 Thr Leu Lys Gln Asn Val Ala Val Ala Gln  
 320 325  
 10 ccagagtcag ctacaagcaa aaagcccttt ccattgatgc acaccaacgt gagattcaag 1551  
 ggaaagggct ttattgattg cagaatgcct actgcattag cggcgctcca ccggaatatt 1611  
 tccaccactg atctggcggg aaatatgaac ggtagacagc atcattactg gcagcacgat 1671  
 15 gatc 1675  
 <210> 2  
 20 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <400> 2  
 25 Met Ser Asn Lys Glu Tyr Arg Pro Thr Leu Ala Gln Leu Arg Thr Phe  
 1 5 10 15  
 Val Thr Ile Ala Glu Cys Lys His Phe Gly Thr Ala Ala Thr Lys Leu  
 20 25 30  
 30 Ser Ile Ser Gln Pro Ser Leu Ser Gln Ala Leu Val Ala Leu Glu Thr  
 35 40 45  
 Gly Leu Gly Val Gln Leu Ile Glu Arg Ser Thr Arg Lys Val Ile Val  
 50 55 60  
 35 Thr Pro Ala Gly Glu Lys Leu Leu Pro Phe Ala Lys Ser Thr Leu Asp  
 65 70 75 80  
 40 Ala Ala Glu Ser Phe Leu Ser His Ala Lys Gly Ala Asn Gly Ser Leu  
 85 90 95  
 Thr Gly Pro Leu Thr Val Gly Ile Ile Pro Thr Ala Ala Pro Tyr Ile  
 100 105 110  
 45 Leu Pro Ser Met Leu Ser Ile Val Asp Glu Glu Tyr Pro Asp Leu Glu  
 115 120 125  
 Pro His Ile Val Glu Asp Gln Thr Lys His Leu Leu Ala Leu Leu Arg  
 130 135 140  
 Asp Gly Ala Ile Asp Val Ala Met Met Ala Leu Pro Ser Glu Ala Pro  
 145 150 155 160  
 55 Gly Met Lys Glu Ile Pro Leu Tyr Asp Glu Asp Phe Ile Val Val Thr  
 165 170 175  
 Ala Ser Asp His Pro Phe Ala Gly Arg Gln Asp Leu Glu Leu Ser Ala  
 180 185 190

Leu Glu Asp Leu Asp Leu Leu Leu Leu Asp Asp Gly His Cys Leu His  
195 200 205

5 Asp Gln Ile Val Asp Leu Cys Arg Arg Gly Asp Ile Asn Pro Ile Ser  
210 215 220

Ser Thr Thr Ala Val Thr Arg Ala Ser Ser Leu Thr Thr Val Met Gln  
225 230 235 240

10 Leu Val Val Ala Gly Leu Gly Ser Thr Leu Val Pro Ile Ser Ala Ile  
245 250 255

15 Pro Trp Glu Cys Thr Arg Pro Gly Leu Ala Thr Ala Asn Phe Asn Ser  
260 265 270

Asp Val Thr Ala Asn Arg Arg Ile Gly Leu Val Tyr Arg Ser Ser Ser  
275 280 285

20 Ser Arg Ala Glu Glu Phe Glu Gln Phe Ala Leu Ile Leu Gln Arg Ala  
290 295 300

Phe Gln Glu Ala Val Ala Leu Ala Ala Ser Thr Gly Ile Thr Leu Lys  
305 310 315 320

25 Gln Asn Val Ala Val Ala Gln  
325

30  
<210> 3  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

35  
<220>  
<223> Primer oxy-exp

40  
<400> 3  
gatcgagaat tcaaaggaag atcagcttag

30

45  
<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> Primer oxy R2

50  
<400> 4  
ggaaaacctc tagaaaaact

20

55

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
  - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators OxyR aufweist.
- 20 2. Polynukleotid gemäss Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäss Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäss Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäss Anspruch 2, enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
  - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur  
5 Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
  - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Polynukleotidsequenz gemäss Anspruch 2, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2  
10 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
7. Coryneforme Bakterien, in denen das oxyR-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
8. Plasmidvektor pT-oxyRexp, der
- 8.1 ein 1400 bp großes internes Fragment der das  
15 oxyR-Gen trägt,
  - 8.2 dessen Restriktionskarte in Figur 2 wiedergegeben wird, und
  - 8.3 der in dem Corynebacterium glutamicum Stamm  
20 DSM5715/pT-oxyRexp unter der Nr. DSM 13457 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen hinterlegt ist.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h  
25 g e k e n n z e i c h n e t, dass man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das oxyR-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere  
30 überexprimiert;

b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

- 5 10. Verfahren gemäss Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien  
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des  
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure  
verstärkt.
- 10 11. Verfahren gemäss Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien  
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest  
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der  
gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 15 12. Verfahren gemäss Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Expression  
des Polynukleotides, das für das oxyR-Gen kodiert  
verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 20 13. Verfahren gemäss Anspruch 12, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man einen mit einem  
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der  
Plasmidvektor die für das oxyR-Gen kodierende  
Nukleotidsequenz trägt.
- 25 14. Verfahren gemäss Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die  
regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids  
(Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid oxyR  
kodiert.
- 30 15. Verfahren gemäss Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, coryneforme  
Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig  
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe



- 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase  
kodierende Gen dapA,
- 15.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat  
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 5 15.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende  
Gen tpi,
- 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende  
Gen pgk,
- 10 15.5 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen  
pyc,
- 15.6 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 15.7 das das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase  
kodierende Gen mqo,
- 15 15.8 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase  
kodierende Gen zwf,
- 15.9 das für die 6-Phosphogluconat Dehydrogenase  
kodierende Gen gnd,
- 15.10 das für die Superoxid-Dismutase kodierende Gen  
sod,
- 20 15.11 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal,
- 15.12 das für eine feed back resistente  
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,

verstärkt bzw. überexprimiert.

- 25 16. Verfahren gemäss Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, coryneforme  
Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig  
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,
  - 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase kodierende Gen pgi
  - 5 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB,
  - 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 abschwächt.
- 
- 10 17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäss Anspruch 1 trägt.
  18. Verfahren gemäss einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt.
  - 15 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator OxyR kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des oxyR-Gens aufweisen, d a d u r c h  
20 g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Polynukleotidsequenzen gemäss Anspruch 1, 2, 3 oder 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.
  20. Verfahren gemäss Anspruch 18, d a d u r c h  
25 g e k e n n z e i c h n e t, dass die Hybridisierung unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
  21. Verfahren gemäß Anspruch 18, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man arrays, micro arrays oder DNA-chips einsetzt.

22. *Corynebacterium glutamicum* Stamm DSM5715/pT-oxyRexp als DSM 13457 hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland.

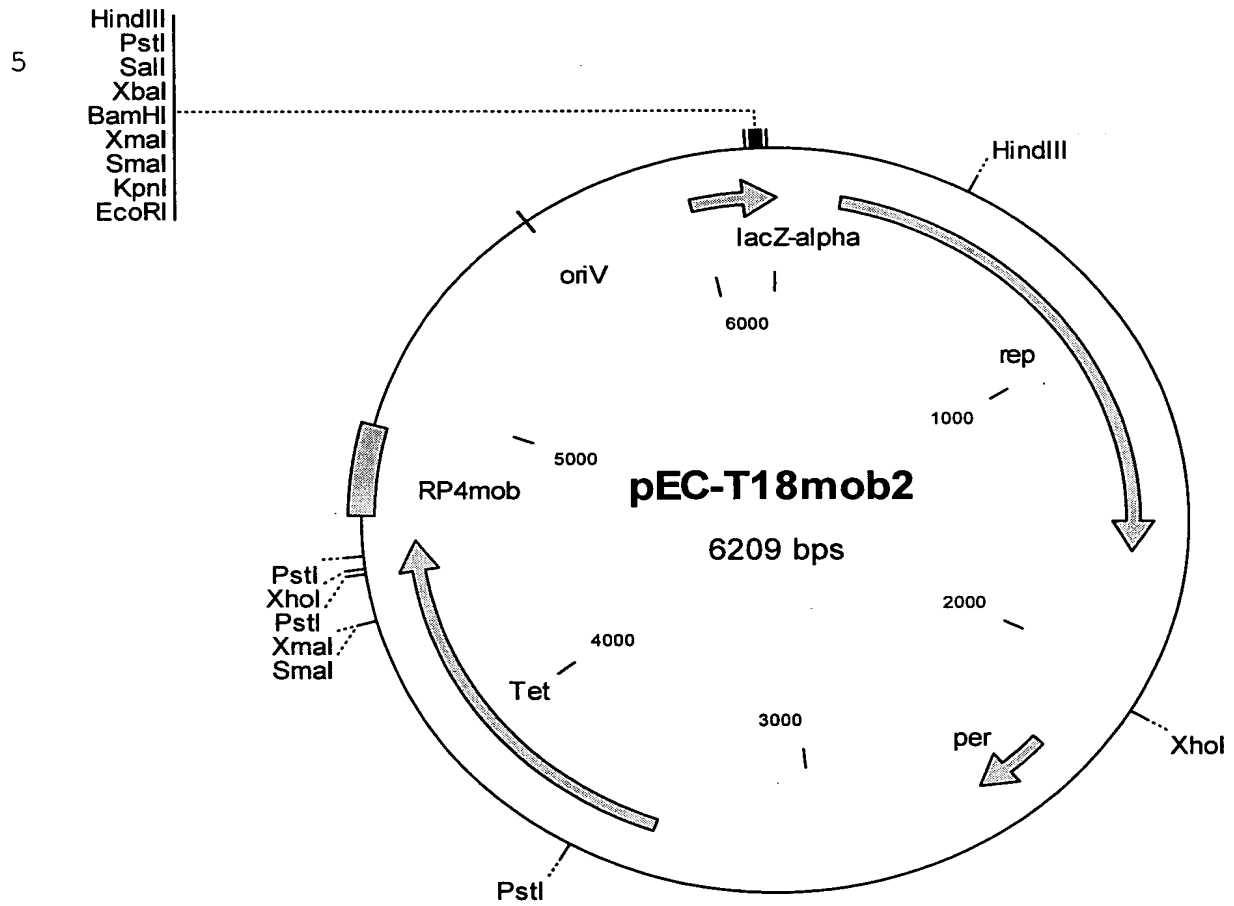
**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

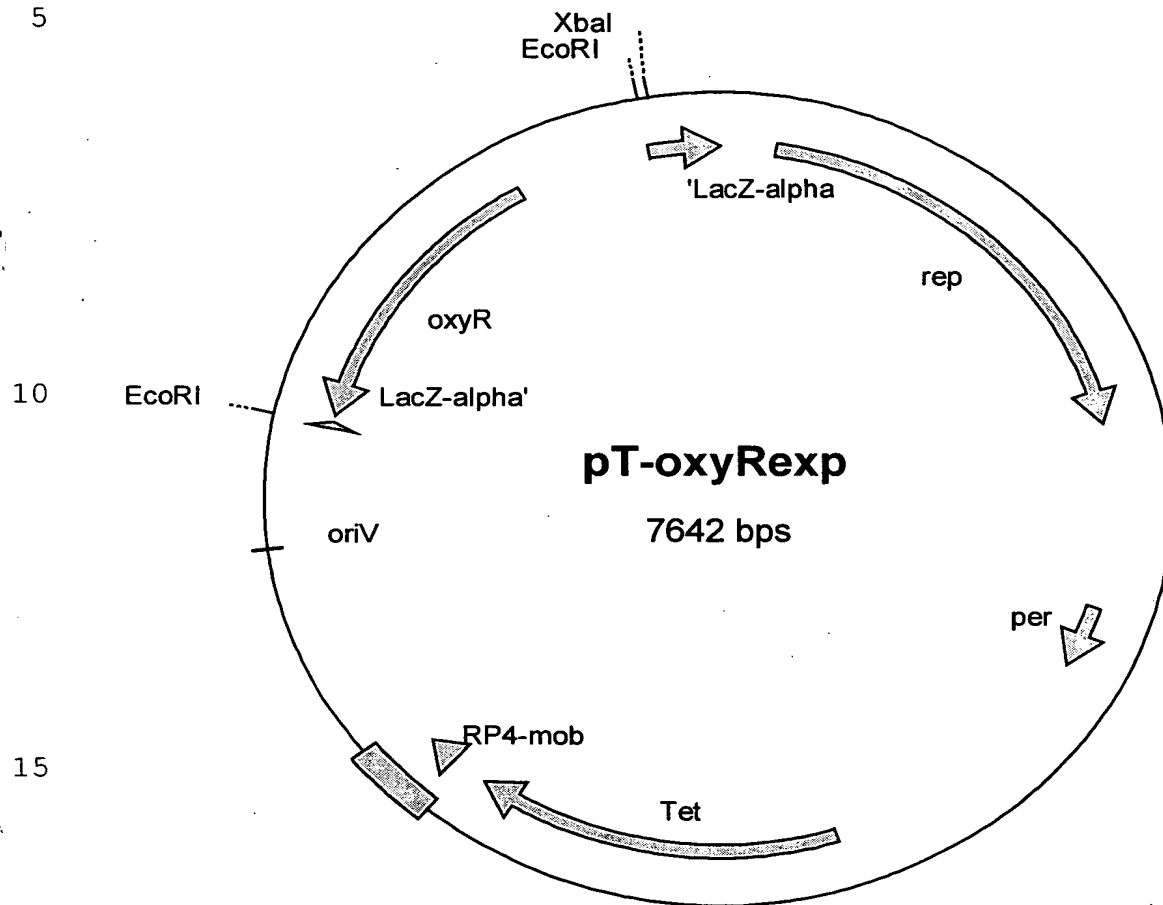
- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 %  
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das oxyR-Gen verstärkt vorliegt, und die  
20 Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Karte des Plasmids pEC-T18mob2



Figur 2: Karte des Plasmides pT-oxyRexp




BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa Hüls AG  
Kantstr. 2

33790 Halle/Künsebeck

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

<b>I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b>	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:  DSM 5715/pT-oxyRexp	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER:  DSM 13457
<b>II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG</b>	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde  <div style="margin-left: 40px;"><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</div> eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
<b>III. EINGANG UND ANNAHME</b>	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2000-04-17 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.	
<b>IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG</b>	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
<b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b>	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  <div style="text-align: center;"> Datum: 2000-05-04</div>

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa Hüls AG  
Kantstr. 2

33790 Halle/Künsebeck

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

<b>I. HINTERLEGER</b>	<b>II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b>
Name: Degussa Hüls AG Kantstr. 2 Anschrift: 33790 Halle/Künsebeck	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 13457 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung <sup>1</sup> : 2000-04-17
<b>III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG</b>	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2000-04-17 <sup>2</sup> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus  (X) <sup>3</sup> lebensfähig ( ) <sup>3</sup> nicht mehr lebensfähig	
<b>IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST<sup>4</sup></b>	
<b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b>	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:   Datum: 2000-05-04

- <sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.  
<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.  
<sup>3</sup> Zutreffendes ankreuzen.  
<sup>4</sup> Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.




BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Degussa Hüls AG  
Kantstr. 2

33790 Halle/Künsebeck

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR:  DSM 5715/pT-oxyRexp	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  DSM 13457
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I. above was accompanied by:  <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation  (Mark with a cross where applicable).	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2000-04-17 (Date of the original deposit) <sup>1</sup> .	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</b>	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):    Date: 2000-05-04

<sup>1</sup> Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE


INTERNATIONAL FORM

Degussa Hüls AG  
Kantstr. 2

33790 Halle/Künsebeck

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

<b>I. DEPOSITOR</b>	<b>II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>
Name: Degussa Hüls AG Kantstr. 2 Address: 33790 Halle/Künsebeck	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 13457  Date of the deposit or the transfer <sup>1</sup> : 2000-04-17
<b>III. VIABILITY STATEMENT</b>	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2000-04-17 <sup>2</sup> . On that date, the said microorganism was  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable  <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no longer viable	
<b>IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED<sup>4</sup></b>	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):    Date: 2000-05-04

<sup>1</sup> Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

<sup>2</sup> In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

<sup>3</sup> Mark with a cross the applicable box.

<sup>4</sup> Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.